

9. 細胞化学部

部長 深澤 征義

概要

細胞化学部の設置目的は、「感染症その他の特定疾病に関する細胞化学的及び細胞生物学的研究に関することをつかさどる」ことであり、細菌、ウイルス、プリオン等病原体の感染増殖に関わる宿主細胞の分子や機能を生化学、細胞生物学、遺伝学を中心とした研究手法を用いて解明し、感染症対策に資する知見や材料(細胞等)を世の中に提供している。また、伝達性海綿状脳症検査に関する調査・研究も行っている。さらに、ワクチン等の生物学的製剤の承認前検査業務にも携わっている。

生化学、細胞生物学および体細胞遺伝学という基盤の上にゲノム編集技術やリビドミクス・メタボロミクス、先端光学顕微鏡技術といった新しい手法も取り入れ、所内外の共同研究も活用しつつ、主に感染宿主細胞側の研究を推進している。感染症対策に資する宿主細胞の改良・開発研究もさらに進めている。

本年度の研究・業務の概略を以下に記載する。

本年度も年度間を通じて COVID-19 蔓延下にあり、最優先業務として COVID-19 対策関連業務に従事した。昨年度から引き続き、「コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)」の国家検定担当として、2種類の新規モダリティ mRNA/LNP ワクチンに関する大量の製造・試験記録等要約書(Summary Lot Protocol; SLP)審査を継続して行い、ワクチンの品質確保・安定的な供給に努めた。年度内に新たに申請された「組換えコロナウイルス(SARS-CoV-2)ワクチン」の承認前検査にも携わった。一方で、通常通りの研究業務を遂行することには大きな困難を伴ったが、COVID-19 対策・対応を優先しつつ可能な限り研究業務についても推進した。

プリオンは、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の多量体(凝集体)から成る病原体である。非定型 H 型ウシ海綿状脳症プリオン(H-BSE プリオン)のヒト・モデルとしてのサルへの伝搬効率について引き続き長期の観察を行った。H-BSE プリオンに罹患したウシの脳乳剤をカニクイザルへ脳内接種後約 5 年間の観察期間を経て解析した結果、脳の各部位の異常型プリオン蛋白質は検出限界以下だった。以上より、H-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播効率は、従来型 BSE(C-BSE)プリオンや非定型 L-BSE プリオンよりも明らかに低いと考えられた。また、異常型プリオンの持続感染が可能なヒト神経芽細胞腫由来培養細胞株を樹立し、さらに改変を進めている。 PrP^{Sc} の凝集体構造については依然として不明であり、新た

な試みとしてラジカル架橋反応による生化学的アプローチを用いた PrP^{Sc} 構造の空間トポロジー解析も進めた。

偏性細胞内寄生細菌クラミジア・トラコマティスに関する研究では、クラミジアの封入体膜タンパク質 IncD と宿主セラミド輸送タンパク質 CERT との結合機序についてさらに解析を進めた。また、CERT 阻害剤が抗クラミジア活性を示すことをこれまでに明らかにしてきたが、CERT 阻害活性を持たない立体異性体の一つが抗クラミジア活性を示すことを発見し、クラミジアの持つ特定の酵素反応が抑制されていることを明らかにした。新規標的の抗クラミジア薬として期待できる可能性がある。

ゲノム編集技術を活用した宿主細胞ゲノムワイドな遺伝子探索から見出した、志賀毒素の感受性に必要な宿主遺伝子の解析をさらに進めた。顕著な成果としては、志賀毒素の受容体である Gb3 の細胞外からの取り込み経路(再利用経路)に関与すると思われる遺伝子群の同定に成功した。また、ムンプスウイルスの細胞侵入に関与する宿主因子の探索を行い、シアロ糖鎖を持つ N 型糖タンパク質が主にウイルス感染に寄与していることをゲノム編集技術を用い明らかにした。さらに、ムンプスウイルスの細胞への結合及び膜融合に特化したアッセイ系を構築し、CRISPR 遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った結果、複数の宿主因子の同定にも成功した。重症血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染に必要な宿主因子を網羅的に明らかにする目的でも、CRISPR 遺伝子ノックアウト細胞ライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行い、候補分子も得ている。

以前より進めている CERT 機能制御メカニズムの解析も継続して行った。特に、リン酸化を介した CERT 機能抑制機序の解析に進展があった。また、小胞体ーゴルジ体膜接触部位での CERT の機能メカニズムについても明らかになってきた。

感染症対策に資する宿主細胞株の樹立・性状解析に関する研究についても、上述した異常型プリオン持続感染ヒト細胞株の樹立に加え、他の細胞株についてもさらに進めた。株化に成功した、黄熱ウイルス(YFV)サブゲノミックレプリコンを維持した Vero 細胞株の性状解析を詳細に行い、YFV 感染細胞と同様の感染(複製)様態を示すことを確認した。ポリオウイルス非感受性 Vero 細胞株を作製し、他の各種ウイルスに対して高感受性を維持していることを確認した。当該細

胞株はポリオ根絶グローバル・アクション・プランに資するものであり、今後様々な感染実験に有用な細胞として広く使用されることが期待される。また、Vero 細胞のゲノムに見いだされたサル内性レトロウイルス配列の性状解析をさらに進め、Vero 細胞の安全性に対する知見の蓄積に努めている。エボラウイルス感染に必須の宿主因子である *NPCI* のノックアウト (KO) 細胞を各種樹立しており、その性状解析もさらに進めた。

抗病原体作用物質に関する研究にも進展が見られた。特に、SFTSV に対しては、これまでの構造活性相関の知見を踏まえ、感染阻害能に重要な *o*-dihydroxybenzene 骨格構造を有する既承認薬として、抗パーキンソン病治療薬の L-DOPA に抗 SFTSV 活性があることを明らかにした。SARS-CoV-2 に対する阻害剤探索のための各種実験系の導入・確立も行い、阻害剤の探索も広範に行っているところである。クラミジアについても、上述したように新規標的の阻害剤を見出し今後の展開が期待される。

感染症研究に新たな最先端の技術を導入すべく、無染色・非侵襲的条件下での病原体感染細胞高解像度解析システム (アボダイズド位相差顕微鏡解析システム) の構築をさらに進めた。従来では見えなかった細胞内微細構造群の動態変化が、無染色かつライブ画像で高精細に捉えられるようになり、今後共同研究も進めて大いに活用していく予定である。また、質量分析装置も共通機器として新規に導入した。当該装置を用いたメタボロミクスやリビドミクス解析を行う基盤を構築し、所横断的な共同研究を開始した。

以上の研究業務に加えて、伝達性海綿状脳症 (TSE) 検査に関するレファレンス業務、上述した SARS-CoV-2 mRNA ワクチンの国家検定を含む品質管理業務についても、計画的に行った。

令和3年4月より、新部長として深澤征義が着任した。SARS CoV-2 mRNA ワクチンの国家検定業務を最優先業務としながら、これまで各部門が進めてきた研究活動を継続発展させるとともに、上述したように最先端の研究技術も導入しながら新たな研究テーマにも積極的に取り組んでいく予定であり、感染症対策に資する、病原体横断的な研究を特に推進していきたい。

業績

調査・研究

I. プリオン、ウイルス等病原体の研究

1. H 型 BSE プリオンに関する研究

非定型 H 型ウシ海綿状脳症プリオン (H-BSE プリオン) がウシからヒトへ伝播する可能性を推測するために、ヒト・モデルとしてカニクイザルへの感染実験を岡山理科大学、予防衛生

協会、感染病理部と共同して行った。H-BSE プリオンに罹患したウシの脳乳剤を脳内接種後、昨年度には観察期間 4 年 10 ヶ月を経た 1 個体、本年度には同 5 年 4 ヶ月を経た 1 個体を安楽殺に処し、脳の各部位の異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の増殖・蓄積の有無を調べた結果、いずれの個体も検出限界以下だった (細胞化学部は生化学分析を担当)。従来型 BSE (C-BSE) や非定型 L-BSE プリオンのカニクイザルへの同様の感染実験研究では、脳内接種ザルは 2~5 年以内にプリオンが蓄積していたことから、H-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播効率は、C-BSE や L-BSE プリオンよりも明らかに低いと考えられた。[萩原健一; 飛梅実、佐藤由子 (感染病理部); 大藤圭子、中野望 (予防衛生協会); 柴田宏昭、小野文子 (岡山理科大)]

2. PrP^{Sc} 凝集体の空間トポロジー解析

プリオンは PrP^{Sc} 凝集体を主成分とすると考えられている。クライオ電顕像からの threading や分子動力学シミュレーションによって PrP^{Sc} 凝集体の複数の構造モデルが提唱されているが、直接的な構造解析は未だ難しい。今回、ルテニウム錯体と光照射によるチロシン残基のラジカル架橋反応 (Chem Biol, 7: 697 (2000)) に着想を得て、この生化学的アプローチによる PrP^{Sc} 凝集体の空間トポロジーの解析を進めた。その結果、ルテニウム錯体が PrP^{Sc} のアミノ基側の領域 (アミノ酸配列のおよそ 110~160 番目) に接近できること、また、この領域が PrP^{Sc} 単量体同士の境界面に位置する可能性があることが推測された。[萩原健一]

3. CERT PH ドメインとクラミジア IncD タンパク質との相互作用に関する研究

クラミジア・トラコマティスは宿主細胞内に封入体と呼ばれる寄生胞を形成し、その内部で増殖する。クラミジア・トラコマティスの増殖には宿主に由来するセラミドが必要であり、そのセラミドは封入体膜に局在化せられた宿主細胞のセラミド輸送タンパク質 CERT によって輸送されている。CERT の局在化は CERT PH ドメインとクラミジアの IncD タンパク質との結合によって誘導される。我々は NMR 解析を用いて、IncD の添加によってケミカルシフト値の摂動が生ずる CERT PH ドメイン上のアミノ酸を突き止めていた。変異体解析によって前年度までに IncD との結合に重要なアミノ酸を3つに絞り込んでいたが、本年度はさらに絞り込みを進め、CERT PH ドメインと IncD との結合がたった1つのアミノ酸変異によって大きく損なわれることを見出した。[熊谷圭悟、花田賢太郎; 杉木俊彦、藤原敏道 (阪大); 児嶋長次郎 (横浜国大)]

II. 感染症に関わる宿主細胞因子の研究

1. ムンプスウイルスの細胞侵入に関与する宿主因子探索のためのゲノムワイドスクリーニング

ムンプスウイルス(MuV)はおたふく風邪の原因ウイルスであり、受容体は酸性糖であるシアル酸を含む糖鎖(シアロ糖鎖)と考えられている。シアロ糖鎖は糖タンパク及び糖脂質として発現しているが、どちらが受容体として寄与しているか不明であった。そこでHeLa細胞においてN型糖鎖(MGAT1)、O型糖鎖(CIGalT1)、糖脂質(UGCG及びCGT)、プロテオグリカン(B3GAT3)、CMP-シアル酸輸送体(SLC35A1)のノックアウト細胞を作製し、ウイルス感染への影響を検討した。その結果、シアロ糖鎖が感染において必須であること、またN型糖鎖が主にウイルス感染に寄与していることを明らかにした。[山地俊之、本間悠太;加藤大志(ウイルス第三部)]

2. ムンプスウイルスの細胞侵入に関与する宿主因子探索のためのゲノムワイドスクリーニング

ムンプスウイルス(MuV)は耳下腺や中枢神経特徴的な組織指向性(耳下腺、中枢神経、脾臓、生殖器など)を示すが、それを規定するウイルスならびに宿主因子については明らかになっていない。ウイルスの細胞侵入に関してシアロ糖鎖は必須であるものの、他の宿主因子に関しては知られていない。そこでウイルスの細胞への結合及び膜融合に特化したアッセイ系を構築し、CRISPR 遺伝子ノックアウトライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、複数の宿主因子の同定に成功した。[本間悠太、山地俊之;加藤大志(ウイルス第三部)]

3. ノロウイルス感染を目指した培養細胞における血液型糖鎖抗原発現細胞の樹立

ヒトノロウイルスのうち多くの遺伝子型は、小腸上皮細胞に発現している ABO 式及びルイス式血液型糖鎖抗原に結合することが知られている。また疫学調査及びボランティア感染実験により、血液型糖鎖発現と感染率に相関のあることが報告されている。ただし、これら血液型糖鎖抗原が実際受容体として機能するかについては解明されていない。この疑問を解明するため、汎用の培養細胞にフコース転移酵素2の他、複数の糖転移酵素の導入を行い、血液型糖鎖抗原の1つH1糖鎖抗原の高発現株の作製に成功した。[柴田鷹、山地俊之;染谷雄一(ウイルス第二部)]

4. 志賀毒素を用いた新たな脂質代謝関連遺伝子のゲノムワイドスクリーニング

これまで志賀毒素による細胞死を指標としたゲノムワイドCRISPRスクリーニングにより、受容体Gb3の生合成に関与する遺伝子群の網羅的な同定に成功している。Gb3を含むスフィンゴ脂質の生合成経路はde novoの新規生合成経路と細胞外からの取り込みを含む再利用経路の2経路があるが、後者の分子機構に関しては不明な点が多く残されている。そこで遺伝子改変により再利用経路に依存した細胞を作製し、これを用いて新たな志賀毒素によるゲノムワイドスクリーニ

ングを行った。その結果、再利用経路に関与すると考えられる遺伝子群の同定に成功した。[朝平凌矢、本間悠太、山地俊之]

5. 志賀毒素受容体Gb3の生合成に影響するLAPTM4AのKOマウス解析

以前の志賀毒素による細胞死を指標としたゲノムワイドCRISPRスクリーニングにより、受容体Gb3の発現に必要な遺伝子としてLAPTM4Aを同定している。ただし個体におけるGb3発現への影響は不明であった。そこでLAPTM4A遺伝子のノックアウトマウスにおいて各臓器のスフィンゴ脂質量をLC-MSで解析した。その結果ノックアウトマウスにおいてGb3の発現低下が確認された。[朝平凌矢、柴田鷹、酒井祥太、山地俊之;金子雅幸(長崎大)]

6. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染に必要な宿主因子の網羅的探索

重症熱性血小板減少症候群は致死率が6-20%と高いが、抗SFTSVの治療薬やワクチンとして日本で承認されたものは未だない。宿主細胞の特定のC-typeレクチンがSFTSV感染に重要なことがこれまでに報告されているが、SFTSVの感染機構については未解明な部分が多く残されている。感染に必要な宿主因子を同定することは治療薬開発にも資すると考え、CRISPR 遺伝子ノックアウトライブラリーを用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。得られた候補因子の中から細胞膜におけるSFTSV受容体候補の遺伝子を選択し、Huh7.5.1-8細胞においてノックアウトを進めた。[深澤征義、入江拓也、水池彩]

7. リン酸化を介したCERT機能抑制機序の研究

小胞体で新規合成されたセラミドはセラミド輸送タンパク質CERTによりゴルジ体へと輸送され、スフィンゴミエリンに代謝される。CERTのN末にはphosphatidylinositol 4-monophosphate (PI4P)結合能を有するpleckstrin homology (PH)ドメインがあり、そのすぐ下流に制御性領域であるセリンリピートモチーフ(serine-repeat motif; SRM)が存在する。SRMが多重リン酸化されると、CERTのPI4P結合活性と、C末領域のSTARTドメインの持つ膜間セラミド輸送活性が同時に抑制される。多重リン酸化SRM依存性の抑制制御がCERT分子内のコイルドコイル様領域(CCR)への変異導入により不全となることを見出し、分子内相互作用によりCERTコンフォメーションが大きく変化してPHドメインとSTARTドメインがお互いマスクするというモデルが支持された。また、CCR領域への変異導入が、CERTオリゴマー体を不安定化することを見出した。[後藤麻子、熊谷圭悟、花田賢太郎]

8. CERTを負に制御するカゼインキナーゼ1 γ の研究

カゼインキナーゼ1 γ (CSNK1G)群はCERTを多重リン酸化することでCERT機能を負の方向に制御している。我々は

これまで HeLa 細胞において CSNK1G 群の遺伝子の1つ *CSNK1G3* の C 末端領域欠失変異により、CERT の多重リン酸化が恒常的に起こり、その結果スフィンゴミエリン合成の阻害を引き起こすことを見出している。本年度はその分子機構の解析を行い、野生型 CSNK1G が C 末端領域(脂肪酸修飾部位を含む)に依存してポスト・ゴルジ領域と推定されるコンパートメントに局在することにより、機能が調節されていることを明らかにした。[後藤麻子、酒井祥太、水池彩、山地俊之、花田賢太郎]

9. CERT 機能場である小胞体—ゴルジ体膜接触ゾーン形成に関する研究

CERT が小胞体—ゴルジ体膜接触部位で適切に機能するために必要な因子の候補として、ゴルジ体上での PI4P 生産に関わる3つの因子 PI4KB, ACBD3, C10orf76 を昨年度までに見出し、解析を進めてきた。本年度は、ACBD3, C10orf76 はそれぞれゴルジ体の近位、遠位領域に PI4P 合成酵素である PI4KB をリクルートすることを超解像顕微鏡観察などから明らかにした。また CERT は、スフィンゴミエリン合成酵素が主に局在する遠位ゴルジ領域に局在するために、C10orf76-PI4KB 軸に依存して合成された PI4P を優先して利用することを見出した。[水池彩、酒井祥太、山地俊之、花田賢太郎; 加藤薫(産業技術総合研究所)]

10. 高浸透圧ストレスにより誘導される CERT のリン酸化

CERT は自身の FFAT モチーフを介して小胞体膜蛋白質 VAP と相互作用する。その際、CERT の FFAT モチーフ近傍に位置する 315 番目のセリン残基(S315)がリン酸化されると、VAP との相互作用が増強され、セラミド輸送機能は更に上昇する。我々は、CERT の S315 部位のリン酸化が高浸透圧ストレスにより顕著に亢進し VAP との相互作用が、小胞体-ゴルジ体接触ゾーンというよりもむしろ小胞体全域において、リン酸化依存的に増強することを見出している。本年度は、高浸透圧条件下における CERT の小胞体-ゴルジ体間におけるセラミド輸送機能を、新規合成 SM を指標に評価した。その結果、野生型 CERT 発現細胞、CERT 欠損細胞のいずれにおいても SM 合成の亢進がみられた。S315 リン酸化に依存した差は認められなかった。また、本条件下では、極長鎖 SM が優先的に合成されていることを見出した。以上の結果から、高浸透圧ストレスにより誘導される CERT S315 リン酸化は VAP-A との相互作用増強に働くが SM 合成の亢進には寄与しないこと、高浸透圧条件下では CERT 非依存的な極長鎖 SM 合成経路が誘導されることが示唆された。[島崎健太郎、熊谷圭悟、花田賢太郎]

III. 感染症対策に資する培養細胞の研究

1. プリオン持続感染が可能な培養細胞の開発

プリオンが持続感染できる培養細胞として、これまでにマウス N2a 細胞などが見出されており、培養細胞レベルのプリオン研究に貢献している。しかし、これらの細胞で持続感染・増殖できるプリオン株は限られており、例えば BSE プリオンは N2a 細胞に持続感染しない。カニクイザル馴化 BSE プリオンは、霊長類プリオンとして興味深い研究資源である。カニクイザル馴化 BSE プリオンが持続感染できる培養細胞はこれまで知られていなかったが、当部ではカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子 (*Prnp*) を導入したヒト神経芽細胞腫由来の細胞が有望であることを見出した。この細胞を新たな研究リソースとして活用することを目指し、細胞の内在性ヒトプリオン蛋白質遺伝子 (*PRNP*) の干渉を排除するために、本年度はゲノム編集による *PRNP* のノックアウトを進めた。[萩原健一]

2. ポリオ根絶グローバル・アクション・プランに資するポリオウイルス非感受性 Vero 細胞株の作製

ポリオ根絶を目指し WHO が策定した行動計画 (Global Action Plan, 3rd edition; GAPIII) への対応を念頭に、ポリオウイルス受容体 (PVR) を欠損させた Vero 細胞由来の新規細胞株を樹立した。ポリオウイルス (PV) 非感受性であることを確認し、また、風疹ウイルス、麻疹ウイルスおよび日本脳炎ウイルスに対しては親株 Vero 細胞と同等の高感受性を維持していることを確認した。Vero 細胞は広汎なウイルスに対して高感受性を示すことが知られており、PVR 欠損 Vero 細胞についても種々のウイルスに対し高感受性を維持していることが期待される。かつての、あるいは今日の PV 流行地域で採取された検体等を取り扱う際、PVR 欠損 Vero 細胞株を用いることにより PV を意図せず増殖させてしまうリスクを回避し、PV 保管施設関連での PV 拡散リスクを最小限に抑えることが可能である。以上の成果を誌上発表し、また、細胞株の公的細胞バンクへの寄託も行なった。[中村優子、齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎; 染谷健二、竹田誠(ウイルス第三部)]

3. 黄熱ウイルス (YFV) サブゲノミックレプリコンを維持する Vero 細胞の性状解析

これまでに YFV (17D-204) 由来サブゲノミックレプリコンの複製が持続的に起こる Vero 細胞 (レプリコン細胞) を樹立している。レプリコン細胞と YFV 感染細胞を固定後、抗体で標識してアポダイズド位相差顕微鏡で観察し、複製タンパク質 NS4B と複製中間体・二本鎖 RNA の細胞内分布を比較した。いずれの細胞においても NS4B タンパク質は主に細胞の核周辺領域に集積し、二本鎖 RNA は一部核周辺に集積しながら細胞内の広い範囲に点状に分布していた。また、両者は部分的に核周辺で共局在していた。分布パターンは両細胞で類似しており、レプリコン細胞が YFV 感染細胞におけるゲノム複製をミミックすることを支持する結果となった。[齊藤恭子、島崎健太郎、中村優子、花田賢太郎; 加藤薫(産業技術

総合研究所)]

4. サル内在性レトロウイルスの性状解析

アフリカミドリザル由来 **Vero** 細胞のゲノムには、完全長で変異のないサル内在性レトロウイルス(SERV)配列が少なくとも2つ存在する。これまでに、SERV 遺伝子の一つをHEK293FT 細胞に導入すると、細胞内と培養上清に SERV RNAが検出されていた。今回、SERVを導入したHEK293FT細胞の培養上清に逆転写酵素活性が認められたことから、導入したSERV 遺伝子からRNAが転写され、ウイルス粒子の産生・発芽が起こる可能性が考えられた。[齊藤恭子、山地俊之、花田賢太郎;佐久間智理(細菌第一部)]

5. NPC1 KO 細胞の脂質解析

これまでに、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、NPC1 KO 細胞を各種細胞株から樹立することに成功している。NPC1 分子はエボラウイルス、マールブルグウイルスの感染に必須の宿主因子であることが知られているが、生理的機能としては、細胞内のコレステロール輸送に関与し、脂質膜環境の恒常性維持に寄与している。親細胞、ノックアウト細胞、NPC1 cDNA 戻し細胞を用いて、主要リン脂質、主要スフィンゴ脂質をマスマスペクトロメトリー法で解析した。その結果、NPC1 KO 細胞におけるコレステロールやスフィンゴミエリンの蓄積が見られたが、スフィンゴ糖脂質については、細胞によって蓄積のパターンが異なることがわかった。[鈴木建、酒井祥太、白砂圭崇、深澤征義]

IV. 抗病原体作用物質に関する研究

1. 重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染に対するカフェ酸と他の薬剤の併用阻害効果

コーヒー抽出物カフェ酸は、重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)感染に対して、主にウイルス粒子自体に作用し、その感染性を失活させることで感染阻害活性を示すことを報告してきた。今回、複製等の他のステップを阻害することが知られている薬剤との併用効果について培養細胞レベルで検討した結果、複製過程を阻害する T-705(ファビピラビル)あるいはリバビリンとカフェ酸の同時処理により、併用効果を示すことが分かった。一方、アモジアキンには、併用効果は見られなかった。[深澤征義;小川基彦、下島昌幸、西條政幸(ウイルス第一部)]

2. L-DOPA/D-DOPA による SFTSV 感染阻害

これまでに、培養細胞感染系を用い、コーヒー抽出物カフェ酸に SFTSV 感染を阻害する活性があることを見出し、構造活性相関研究から、阻害活性には *o*-dihydroxybenzene 構造が重要であることを示してきた。そこで、既存の承認薬の中から *o*-dihydroxybenzene 骨格を有する化合物を検索した結果、抗パーキンソン病治療薬の L-DOPAが見出された。L-DOPA

およびそのエナンチオマーである D-DOPA の抗 SFTSV 活性を検討した結果、カフェ酸よりも強い阻害活性を示すことが明らかとなった。また、その阻害メカニズムの解析から、L-DOPA/D-DOPA は、カフェ酸と同様に、主にウイルス粒子自体に作用し、その感染性を失活させることでウイルス感染を阻害していることも明らかとなった。[深澤征義、村江真奈、玄葉隆太郎、入江拓也;小川基彦、下島昌幸、西條政幸(ウイルス第一部);野口耕司(東京理科大)]

3. SARS-CoV-2 阻害剤探索のための実験系の導入・確立

COVID-19 のパンデミックに対して、ワクチンが有効性を示しているものの、治療薬のニーズは依然高い。治療薬スクリーニングに向けて、様々な実験系の導入と確立を行った。1) SARS-CoV-2 シュードウイルス感染系、2) SARS-CoV-2 spike タンパク質依存的な細胞融合アッセイ系、3)リコンビナント SARS-CoV-2 spike タンパク質及び可溶性 ACE2 タンパク質を用いた、spike-ACE2 相互作用検出 ELISA 系、4)生ウイルス感染系等について、多検体で実施可能な系を確立した。変異型ウイルスにも対応できるように、各変異型ウイルスの研究材料もそろえた。[深澤征義、清水芳実、村江真奈、酒井祥太、中村優子;小川基彦(ウイルス第一部);野口耕司(東京理科大)]

4. SARS-CoV-2 感染に対する中分子阻害剤の探索

上述した SARS-CoV-2 阻害剤探索系を用いて、特に、SARS-CoV-2 spike-ACE2 間のタンパク質-タンパク質相互作用を阻害する化合物のスクリーニングを、独自の中分子化合物ライブラリーを用いて開始した。その結果、用量依存的に SARS-CoV-2 感染を阻害する新規化合物が複数個得られてきている。構造情報をもとに、類縁体解析を進め、より阻害活性の高い化合物の取得を目指している。[深澤征義、村江真奈、清水芳実、酒井祥太、水上智晴、染谷友美、稲森陽子;小川基彦(ウイルス第一部);野口耕司(東京理科大);大澤匡範(慶應大)]

5. 発酵大豆成分の日本脳炎ウイルス増殖に対する効果

イソフラボン類には様々な健康機能があり、抗ウイルス効果を持つとの報告がある。大豆イソフラボン類及び関連する発酵大豆由来成分の日本脳炎ウイルス(JEV)に対する効果を検討した。その結果、発酵大豆胚芽抽出物(主成分:大豆イソフラボンアグリコン)と発酵脱脂大豆抽出物に JEV 増殖阻害活性を見出した。今後は標的となるウイルス増殖のステージならびに阻害メカニズムについて解析する。[北谷明大、齊藤恭子、深澤征義;高橋勝彦、東 伸昭(星薬大);天海智博(ニチモウバイオティックス)]

6. CERT 阻害剤の立体異性体による未知のメカニズムを介した抗クラミジア活性の発見

各種 CERT 阻害剤、および、その立体異性体がクラミジア・

トラコマティスの増殖に与える影響について検討している。これらの化合物の抗クラミジア活性は概ね CERT 阻害活性の強さと相関していたが、ある化合物の立体異性体は CERT への阻害活性をほとんど示さないにもかかわらず、クラミジアの増殖を顕著に抑制することが分かった。各種検討を行った結果、この化合物がクラミジアの特定の酵素反応を抑制していることが判明した。また、電顕解析により、この化合物はクラミジア・トラコマティスの分化を抑制または遅延させていることが判明した。当該化合物およびその立体異性体による抗クラミジア活性は酵素反応の抑制活性または CERT の阻害活性と相関しており、関連性が高いと予想された。[熊谷圭悟、花田賢太郎;上野雅晴(徳島大学);小林修(東京大学)]

V. 最先端機器を用いた感染症研究

1. ウイルス感染細胞の無染色・非侵襲的条件下でのライブ観察

昨年度構築したアポダイズド位相差顕微鏡解析システムを用いたライブイメージングに向けて、培養条件の最適化を行うとともに、システムの改善を図った。種々のウイルス感染細胞について、無染色・非侵襲的条件下で高解像度のライブイメージングを予備的に実施した。[中村優子、島崎健太郎、齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎;加藤薫(産業技術総合研究所)]

2. アポダイズド位相差像におけるオルガネラの同定

アポダイズド位相差顕微鏡システムを用いて HeLa 細胞および Vero 細胞の無染色ライブイメージングを行った。ミトコンドリアなど特徴的な形態を有するオルガネラは比較的高い精度で同定可能であり、網目構造の小胞体も条件によっては観察可能であった。また、球状の小胞形態を持つオルガネラは、特異的なオルガネラ標識を導入して平行観察するといった同定作業を随時行う必要があることが示唆された。[島崎健太郎、中村優子、齊藤恭子、花田賢太郎;加藤薫(産業技術総合研究所)]

レファレンス業務

I. 伝達性海綿状脳症(TSE)検査

TSE 行政検査・確認検査(ウエスタンブロット法)の担当、等。

TSE 行政検査・確認検査体制(ウエスタンブロット法)を毎年維持した。また、試薬等の品質と検査手技の管理を目的として、過去の BSE 陽性ウシおよび陰性ウシを模擬検体とする内部精度管理試験を行い、試験成績を厚生労働省 医薬・生活衛生局 食品監視安全課へ報告した(令和3年10月、令和4年2月実施)。[萩原健一、中村優子]

品質管理に関する業務

I. 新型コロナウイルスワクチンに対する承認前検査と検定検査

1. ファイザー社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)の国家検定

国家検定として、昨年度から引き続きファイザー社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)の製造・試験記録等要約書(Summary Lot Protocol;SLP)審査を行った。[深澤征義、萩原健一、齊藤恭子、中村優子]

2. モデルナ社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)の国家検定

国家検定として令和3年5月21日付けで日本での製造販売承認がされたモデルナ社製コロナウイルス修飾ウリジン RNA ワクチン(SARS-CoV-2)の製造・試験記録等要約書(Summary Lot Protocol;SLP)審査を行った。[山地俊之、熊谷圭悟、酒井祥太、深澤征義]

3. ノババックス社製組換えコロナウイルス(SARS-CoV-2)ワクチンの承認前検査

新型コロナウイルス感染症に対してノババックス社が開発した組換えコロナウイルスワクチンの日本での製造販売承認申請が武田薬品工業株式会社からなされたことに伴い、他部との連携を図り、2つの試験について承認前検査を行った。

[酒井祥太、萩原健一、深澤征義]

4. 生物製剤基準と日本薬局方との関係性の整理に向けた検討

生物学的製剤基準(生物基)は通則、医薬品各条、一般試験法からなる薬機法第42条に基づいて制定された生物学的製剤の基準集である。一方、日本薬局方(日局)は、通則、生薬総則、製剤総則、一般試験法及び医薬品各条からなる薬機法第41条に基づいて制定された医薬品の規格基準書である。両者の関係を整理することは、国際薬局方(IP)、欧州薬局方(EP)、米国薬局方(USP)、WHO Recommendations/Guidelines などとの国際的ハーモナイゼーションを行っていく上でも非常に重要である。そこで、日局の通則および各条で生物基と関連する項目をピックアップし、重複や齟齬について調査を行った。両基準は繰り返し改定が行われているものの、すり合わせが十分に行われてこなかったせいか、齟齬も複数認められ、表現の不統一も多数見られることが改めて明らかになった。今後、早急に各専門家による内容の統一化を進め、統合化に向けた検討も始めるべきと思われた。

[深澤征義]

その他

1. (独)医薬品医療機器総合機構 GLP 専門協議の専門委

員[深澤征義]

2. 厚生労働省医薬・生活衛生局 食品監視安全課 牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議委員[中村優子]
3. 内閣府食品安全委員会プリオン専門調査会専門委員[中村優子]
4. 農林水産省食料・農業・農村政策審議会臨時委員[中村優子]
5. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会臨時委員(日本薬局方部会員)[深澤征義]
6. 機器管理運営委員会機器の管理と運用

戸山庁舎のトリプル四重極リニアイオントラップ型質量分析機(3200QTRAP)の保守・運用を行い、適切な節電対策を講じた。また、新規質量分析装置 LC-MS8060NX を導入し、運営を開始した。当該装置を用いたメタボロミクスやリピドミクス解析を行う基盤を構築した。本手法を用いて、所横断的な共同研究を開始した。[酒井祥太、花田賢太郎、深澤征義]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamanaka A, Matsuda M, Okabayashi T, Pitaksajakul P, Ramasoota P, Saito K, Fukasawa M, Hanada K, Matsuura T, Muramatsu M, Shioda T, Suzuki R. Seroprevalence of Flavivirus Neutralizing Antibodies in Thailand by High-Throughput Neutralization Assay: Endemic Circulation of Zika Virus before 2012. *mSphere*, 6, e0033921, 2021.
- 2) Shimizu Y, Suzuki T, Shirasago Y, Kondoh M, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa M. Antiviral effects of the anti-occludin monoclonal antibody on persistent hepatitis C virus infection in a human liver chimeric mouse model. *BPB Reports*, 4, 142-147, 2021.
- 3) Ogawa M, Murae M, Gemba R, Irie T, Shimojima M, Saijo M, Noguchi K, Fukasawa M. L-DOPA, a treatment for Parkinson's disease, and its enantiomer D-DOPA inhibit severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in vitro. *J. Infect. Chemother.*, 28, 373-376, 2022.
- 4) Murae M, Shimizu Y, Yamamoto Y, Kobayashi A, Hourii M, Inoue T, Irie T, Gemba R, Kondo Y, Nakano Y, Miyazaki S, Yamada D, Saitoh A, Ishii I, Onodera T, Takahashi Y, Wakita T, Fukasawa M*, Noguchi K*. The function of SARS-CoV-2 spike protein is impaired by disulfide-bond disruption with mutation at cysteine-488 and by thiol-reactive N-acetyl-cysteine and glutathione.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 597, 30-36, 2022.

(*co-corresponding)

- 5) Okemoto-Nakamura Y, Someya K, Yamaji T, Saito K, Takeda M, Hanada K. Poliovirus-nonsusceptible Vero cell line for the WHO global action plan. *Sci Rep*, 11, 6746, 2021.
- 6) Sakuma C, Sekizuka T, Kuroda M, Hanada K, Yamaji T. Identification of SYS1 as a host factor required for Shiga toxin-mediated cytotoxicity in Vero cells. *Int J Mol Sci*, 22, 4936, 2021.
- 7) Kato F, Nakatsu Y, Murano K, Wakata A, Kubota T, Hishiki T, Yamaji T, Kidokoro M, Katoh H, Takeda M. Antiviral activity of CD437 against mumps virus. *Front Microbiol*, 12, 751909, 2021.
- 8) Konishi K, Yamaji T, Sakuma C, Kasai F, Endo T, Kohara A, Hanada K*, Osada N*. Whole-genome sequencing of Vero E6 (VERO C1008) and comparative analysis of four Vero cell sublines. *Front Genet*, 13, 801382, 2022. (*co-corresponding)
- 9) Shimasaki K, Kumagai K*, Sakai S, Yamaji T, Hanada K*. Hyperosmotic Stress Induces Phosphorylation of CERT and Enhances Its Tethering throughout the Endoplasmic Reticulum. *Int J Mol Sci*, 23, in press. (*co-corresponding)
- 10) Hanada K, Sakai S, Kumagai K. Natural Ligand-Mimetic and Nonmimetic Inhibitors of the Ceramide Transport Protein CERT. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 2098, 2022.
- 11) Mutoh T, Niimi Y, Sakai S, Watanabe H, Ueda A, Shima S, Igarashi Y. Species-specific accumulation of ceramides in cerebrospinal fluid from encephalomyeloradiculoneurphy patients associated with peripheral complement activation: A pilot study. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 1867(3), 159092, 2022.
- 12) Tamura N, Sakai S, Martorell L, Colomé R, Mizuike A, Goto A, Ortigoza-Escobar J*, Hanada K*. Intellectual disability-associated mutations in the ceramide transport protein gene CERT1 lead to aberrant function and subcellular distribution. *J. Biol. Chem.*, 297(5), 101338, 2021. (*co-corresponding)

2. 和文発表

- 1) 齊藤恭子(翻訳、分担)グッドマンギルマン薬理書第13版第62章:抗ウイルス薬(抗レトロウイルス薬を除く)、廣川書店(2022.1.30 発刊)

- 2) 深澤征義 (翻訳、分担)グッドマンギルマン薬理書第13版第59章:タンパク合成阻害薬およびその他の抗菌薬、廣川書店(2022.1.30 発刊)
- 3) 1) 野口耕司、斎藤顕宜、宮崎智、深澤征義 新型コロナウイルスの感染メカニズム、理大科学フォーラム、422, 2-5, 2021
- 4) 清水芳実、深澤征義 効率的な培養細胞 C 型肝炎ウイルス感染系の構築、創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学、335-340, 2021

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Monaco-Brown M, Cerone J, Ogbamikaël S, Yager E, Yamaji T, Barroso M, Hanada K, Konan K. Modulation of Zika virus replication via glucosylceramide synthase and glycosphingolipids, Pediatric Academic Societies 2021, Virtual Meeting, 2021.4.30-5.4.
- 2) Miura A, Kabayama K, Manabe, Shuto Miyake Y, Shirakawa A, Shomura H, Yamaji T, Suzuki KGN, Fukase K. Quantitative Analysis of Galectin-dependent Glycoprotein Dynamics by using Synthetic Glycan Displaying System on the Cell Surface. Pacificchem 2021, Virtual Meeting, 2021/12

2. 国内学会

- 1) 井上徹哉、山本雄一朗、村江真奈、深澤征義、金子美華、加藤幸成、野口耕司 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の S2 領域を認識する中和抗体の探索、第 65 回日本薬学会関東支部大会、2021.9.11、オンライン。
- 2) 村江真奈、清水芳実、入江拓也、玄葉隆太郎、野口耕司、深澤征義 新型コロナウイルス侵入阻害剤の簡便なスクリーニング系構築、第 65 回日本薬学会関東支部大会、2021.9.11、オンライン。
- 3) 小川基彦、下島昌幸、西條政幸、深澤征義 緑茶由来フラボノイド類の重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する増殖抑制効果、第 3 回 SFTS 研究会学術集会、2021. 9. 17、オンライン。
- 4) 島崎健太郎、加藤薫、中村優子、齊藤恭子、深澤征義、花田賢太郎 アポダイズド位相差顕微鏡による無染色・非侵襲での細胞内微細構造動態の観察、第 30 回日本バイオイメーキング学会学術集会、2021. 9. 9-10、オンライン。
- 5) 齊藤恭子、深澤征義、鈴木亮介、高崎智彦、花田賢太郎 Vero 細胞における黄熱ウイルス 17D 株サブゲノミックレプリコンの持続的な複製の性状解析、第 68 回日本

ウイルス学会学術集会、2021. 11. 16-18、神戸国際会議場/オンライン。

- 6) 小川基彦、村江真奈、玄葉隆太郎、入江拓也、下島昌幸、野口耕司、西條政幸、深澤征義 パーキンソン病治療薬 L-DOPA および光学異性体 D-DOPA の重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する抗ウイルス活性、日本薬学会第142年会、2022.3.25-28、オンライン(名古屋)。
- 7) 山本雄一朗、村江真奈、清水芳実、小林明日香、祝部真澄、井上徹哉、入江拓也、玄葉隆太郎、斎藤顕宜、宮崎智、石井功、深澤征義、野口耕司 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質における Cys-488 残基の機能とチオール化合物の影響、日本薬学会第142年会、2022.3.25-28、オンライン(名古屋)。
- 8) 米澤朋起、清水祐吾、池田和由、山本雄一朗、野口耕司、酒井祥太、深澤征義、横川真梨子、大澤匡範 COVID-19 の原因となるタンパク質-タンパク質相互作用を標的とする合成中分子阻害剤の in silico 解析、日本薬学会第142年会、2022.3.25-28、オンライン(名古屋)。
- 9) 北谷明大、齊藤恭子、天海智博、高橋勝彦、東伸昭、深澤征義 発酵大豆由来成分の日本脳炎ウイルス増殖に対する効果、日本薬学会第142年会、2022.3.25-28、オンライン(名古屋)。
- 10) 井上徹哉、山本雄一朗、村江真奈、深澤征義、金子美華、加藤幸成、野口耕司 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の S2 領域を認識する中和抗体の探索、日本薬学会第142年会、2022.3.25-28、オンライン(名古屋)。
- 11) 三浦彩音、樺山一哉、真鍋良幸、三宅秀斗、白川明日香、初村洋紀、山地俊之、鈴木健一、深瀬浩一 合成糖鎖提示手法を用いた糖鎖-ガレクチン相互作用によるタンパク質動態制御、第 15 回ケミカルバイオロジー学会、2021.6.21-23、オンライン。
- 12) 後藤麻子、水池彩、山地俊之、花田賢太郎 カゼインキナーゼ 1 γ の C 末端領域依存的な細胞内局在の変化がスフィンゴミエリン生合成におけるセラミド輸送に影響を及ぼす、第 73 回日本細胞生物学会、2021.6.29-7.2、オンライン(京都)。
- 13) 三浦彩音、樺山一哉、真鍋良幸、三宅秀斗、白川明日香、初村洋紀、山地俊之、鈴木健一、深瀬浩一 生細胞表層への合成糖鎖導入および糖鎖-レクチン相互作用の分子化学的解析、第 40 回日本糖質学会年会、2021.10.27-29、鹿児島 オンラインハイブリッド。
- 14) 秋山央子、山地俊之、水谷泰彰、新美芳樹、武藤多津郎、上口裕之、平林義雄 ヒト脳脊髄液には志賀毒素

と反応する新奇糖脂質が存在する、第 94 回日本生化学会大会、2021.11.3-5 オンライン(横浜).

- 15) 内野美佳子、黒澤静霞、山地俊之、相川京子
ANXA1 をキャリアとした細胞内で作用する標的結合タンパク質の創出 第 94 回日本生化学会大会、2021.11.3-5 オンライン(横浜).
- 16) 石井克幸、関塚剛史、本間悠太、山地俊之 ゲノムワイド CRISPR スクリーニングによる HPV 細胞侵入に必要な宿主因子の同定 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、2021. 11. 16-18、神戸 オンラインハイブリッド.
- 17) 佐々木桂奈江、森下史、足立拓弥、渡部雄斗、若林貞夫、櫻井香里、養王田正文、山地俊之、花田賢太郎、吉田秀郎 抗がん剤 OSW-1 が引き起こすゴルジ体ストレス依存性細胞死は PI4P 代謝因子によって制御される 第 44 回日本分子生物学会年会、2021.12.1-3 横浜.
- 18) 水池彩、酒井祥太、加藤薫、山地俊之、花田賢太郎
小胞体-ゴルジ体間セラミド輸送ゾーンの形成に重要な PI4KB 結合因子の解析、第 44 回日本分子生物学会年会、2021.12.1-3 横浜.
- 19) 中山仁志、花房慶、山地俊之、大嶋恵理子、堀田知美、岩渕和久 抗リポアラビノマンナン抗体の結合特異性ならびに自然免疫細胞による抗酸菌貪食への効果に関する検討 第 6 回糖鎖免疫研究会、2022.3.10、東京.